

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007年～2008年  
 課題番号：19700595  
 研究課題名(和文) AMP 経口摂取による AMPK 活性の増強と肥満およびインスリン抵抗性改善効果の検討  
 研究課題名(英文) Does the AMP ingestion improve obesity and the insulin resistance by reinforcing the AMPK revitalization?  
 研究代表者  
 樹山 敦子 (KIYAMA ATSUKO)  
 県立広島大学・人間文化学部・助教  
 研究者番号：70405504

研究成果の概要：肥満および糖尿病を発症させた動物モデルでは、摂食中枢や骨格筋での AMPK(AMP activated kinase) 活性が変化しており、エネルギー代謝異常に関与していることが示唆されている。本研究では、AMP の経口摂取が AMPK 活性の増強やエネルギー代謝異常の改善に有効であるか、AMP の栄養生理物質としての可能性について検討した。その結果、糖のみを摂取した時に対して AMP を同時に摂取した場合、インスリン感受性の亢進と血糖上昇の緩和が認められた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：栄養生理学、基礎栄養学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：特殊栄養食品、栄養補助成分

## 1. 研究開始当初の背景

世界レベルで肥満症、糖尿病、また生活習慣病の複合により重篤な病態につながるメタリックシンドロームの患者は急増しており、わが国も例外ではない。肥満症や糖尿病といった疾患は、食生活や運動習

慣の改善により防ぐことが可能な場合が多く、予防医学的にも食と運動への取組みの必要性が強く訴えられている。しかし、肥満症のヒトが適正な体重まで減量したとしても、健常者に比べてその適正体重を維持することが難しく、リバウンド

現象を示すことが多い。これは肥満期には抗肥満ホルモンであるレプチンに対する感受性が低下しており、血中レプチン濃度が少し下がっただけでも食欲の亢進が起こることが原因だと考えられている。肥満症やインスリン抵抗性の改善にレプチン投与が有効だという報告もあるが、その効果はレプチン欠損体においてであり、過食による肥満症やインスリン抵抗性の患者に対してはレプチン投与の効果は見られないという。

近年、レプチンの作用がAMPK活性を介することが明らかになり、注目された。すなわち、レプチンによる脳視床下部での摂食行動抑制や、骨格筋での糖の取り込みと脂肪酸酸化の促進はAMPK活性によって惹起される (Y. Minokoshi et al., *Nature* 428(2002) 569-574.)。また、運動による骨格筋の収縮によってもAMPKは活性化され、糖の取り込みが促進することが報告されている。一方で、長期の高脂肪食摂取により肥満および糖尿病を発症したマウス (Diet-induced obesity mouse; DIO) では、レプチン抵抗性だけではなく脳視床下部や骨格筋でのAMPK活性が変化しており、エネルギー代謝の異常に拍車をかけていることを示唆する報告 (T. L. Martin et al., *J. Bio. Chem.* 281(2006) 18933-18941.) もあり、AMPKが肥満や糖尿病などの進行に深く関わっていることが考えられる。これらのことから、糖の取り込みやエネルギー消費に直接関するキナーゼであるAMPKの活性を増強することが肥満症や糖尿病の改善において、力強いサポーターになると考えられる。そこで、AMPKの基質であるAMPに着目し、その摂取が肥満およびインスリン抵抗性の改善に有効であるかを検討することとした。

## 2. 研究の目的

AMPK(AMP activated kinase) はAMPを基質とするキナーゼで、様々な代謝経路のメディエーターである。AMPKは細胞内のAMP/ATP比が上昇することにより活性化される。こ

のAMP/ATP比は、レプチン、アデipopネクチン、インスリンなどのホルモン刺激や血糖の低下、低酸素状態、熱刺激などによっても変化する。

これまでにAMPKに関する様々な先行研究がなされているが、ホルモン作用の指標としてアゴニスト、アンタゴニストを用いてAMPK活性を測定したものや、エネルギー代謝とAMPK活性の関連性を検討した報告が多く、『AMPK自体の活性を増強する』という視点からの検討はほとんどなされていない。レプチン抵抗性、インスリン抵抗性を示す個体において、血糖の低下や低酸素状態などの生命に危険な状態ではなく、安全で、かつAMPK活性を直接に亢進させる因子を与えることが、エネルギー代謝の正常化と生命維持を考える上で大切である。

すでにマウスへAMPを混ぜた餌を与えた場合に、腸管での糖吸収が亢進することが確認されているが、その作用がAMPK活性亢進によるのかは明らかではない。そこで、AMP摂取がAMPK活性の増強に有効であるかを検討するとともに、エネルギー代謝におけるAMPの生理活性物質としての役割について解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

C57BL/6JマウスはAMP投与前24時間絶食させ(自由飲水)、5% Glucose液、5%、10%、15%のAMPを添加したGlucose/AMP混液ゾンデを用いてマウスへ経口投与し(0.5 ml/匹)た。投与後、5、10、15、30、分から180分後まで30分ごとにエーテル麻酔下で心臓または門脈より採血し、分析には血漿を用いた。組織および筋肉は採取後液体窒素で凍結し分析に用いるまで-80℃で保存した。

### (1) 血液成分の分析

血糖はグルコースC-テストワコー(和光純薬)を用いて測定した(酵素法)。

血中遊離脂肪酸はデタミナーNEFA(協和メデックス)を用いて測定した(酵素法)。

血中インスリンは森永超高感度イ

ンスリン測定キットを用いて測定した(サンドイッチELISA法)。

(2) AMPK活性の測定

肝臓、膵臓、小腸、骨格筋(ヒラメ筋および長肢伸筋)は採取後すぐに液体窒素で凍結し、-80で保存した。各組織はLysis Buffer A[E. K. Kim et al., J. Biol. Chem. 279 (2004) 19970-19976]で可溶化し、SDS-PAGEで展開後、Western blot法により検出した。検出したAMPおよびPhospho-AMP(P-AMPK)をNIH imagerを用いて定量化し、AMPの活性レベルを測定した。AMPおよびP-AMPKの検出については抗AMP抗体、抗P-AMPK抗体(Cell signaling)を用いた。

4. 研究成果

血糖に対するAMP濃度の検討の結果、AMP10%液投与群において投与後15分から有意に血糖上昇が抑制され、15%液との差が見られなかったことから他の解析は10%液投与群についてのみ行った(Figure 1)。

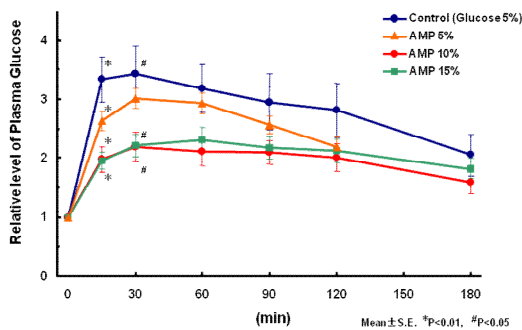


Figure 1. Effect of AMP oral administration on the relative level of plasma glucose.

血中インスリン濃度は投与後5分では差は認められなかったが、その後AMP群ではコントロール群のような急激な血中インスリン濃度の上昇はみられず、血糖に連動して緩やかな低下を示した(Figure 2a, 2b)。

血中中性脂肪は両群に違いが認められなかったが、遊離脂肪酸は両群とも投与から15分後にかけて低下したが、その幅はAMP群で大きく、その後の上昇も抑えられた(Figure 2c, 2d)。

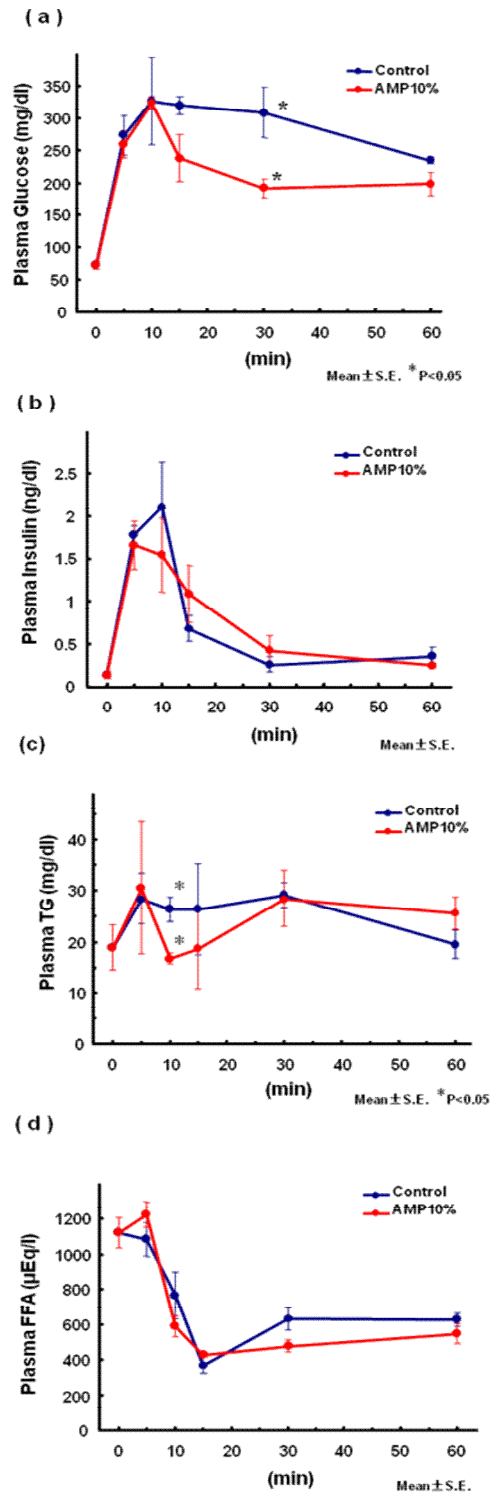


Figure 2. Effect of 10% AMP ingestion on the plasma glucose, insulin, triacylglycerol and free fatty acid levels.

肝臓、膵臓、小腸、および骨格筋におけるAMPK活性については明確な違いは認められなかった。

今回の結果から、AMP 経口摂取によってインスリン感受性を高められ、血糖上昇および脂肪酸合成を緩やかになること、また糖の流入による脂肪分解抑制を増進することが示唆された。すなわち血糖や脂質コントロールが重要な疾病において AMP が有益な生理物質となりうることを示唆している。しかし、各組織における AMPK 活性への影響については明らかにならず、分析方法や条件の再検討を行う必要がある。また、骨格筋での糖吸収の増進や肝臓での解糖系、グリコーゲン合成の促進など、急速な糖利用への影響についてなど、さらなる追究が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件)

樹山 敦子、AMP 経口摂取による糖吸収への影響、第 54 回日本栄養改善学会学術総会、2007 年 9 月 20 日、長崎ブリックホール

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

樹山 敦子 (KIYAMA ATSUKO)  
県立広島大学・人間文化学部・助教  
研究者番号：70405504